

## **DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO E COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DE LÍQUIDOS IÔNICOS FARMACÊUTICOS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE DISOCIACIÓN Y COEFICIENTE DE PARTICIÓN DE LIQUIDOS IÓNICOS FARMACÉUTICOS CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA  
DETERMINING THE DISSOCIATION CONSTANT AND PARTITION COEFFICIENT OF PHARMACEUTICAL IONIC LIQUIDS WITH ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

Alexandre Marques (alexchelsea1@hotmail.com)\*

Ana Dias (anafilipavd3@hotmail.com)\*

André R.T.S. Araujo (andrearaujo@ipg.pt)\* \*\*

Ana Azevedo (aazevedo@ff.up.pt)\*\*\*

Paula Pinto (ppinto@ff.up.pt)\*\*\*

M. Lúcia M.F.S. Saraiva (lsaraiva@ff.up.pt)\*\*\*

### **RESUMO**

Os líquidos iónicos (LIs) têm mostrado um enorme potencial em diversas áreas quer a nível laboratorial, quer a nível industrial. Estes compostos são geralmente definidos como sais orgânicos constituídos por um catião orgânico e um anião orgânico ou inorgânico com pontos de fusão inferiores a 100° C.

Neste trabalho foi estudada a interação de LIs contendo o catião colina e os aniões ibuprofenato, naproxenato e cetoprofenato, com a Albumina do Soro Humano (ASH) por espectralfluorimetria. A ASH foi selecionada por ser a proteína mais abundante no plasma e apresentar fluorescência intrínseca que pode ser reduzida por interação com fármacos, possibilitando a avaliação da afinidade de ligação às proteínas plasmáticas pelos LIs-APIs (do inglês Active Pharmaceutical Ingredients). Concomitantemente foi analisada a partição dos três LIs-APIs, entre as fases aquosa e lipídica, formada por micelas de hexadecilfosfolina, que foram selecionadas por exibirem similaridade estrutural com os lípidos presentes nas membranas biológicas. Este ensaio permitiu o cálculo do coeficiente de partição (K<sub>p</sub>) por espectralfotometria derivativa no ultravioleta-visível.

Os resultados obtidos no estudo da interação dos LIs-APIs com a ASH revelam que o naproxenato de colina estabelece uma ligação mais forte à ASH comparativamente ao naproxeno. Por sua vez, os valores de K<sub>p</sub> evidenciam um aumento da partição do ibuprofenato de colina relativamente ao ibuprofeno, sugerindo uma melhoria da capacidade de atravessar as membranas biológicas.

**Palavras-chave:** *líquidos iónicos farmacêuticos; constante de dissociação; coeficiente de partição; metodologias espectraloscópicas.*

### **ABSTRACT**

Ionic liquids (ILs) have shown great potential in a number of laboratory and industrial settings. These compounds are generally defined as organic salts consisting of an organic cation and an organic or inorganic anion with melting points below 100 °C. In the present study, the interaction of ILs containing the cation choline and the anions ibuprofenate, naproxenate and ketoprofenate were evaluated with human serum albumin (HSA) by spectrofluorometry. HSA was selected as it is the protein most abundant in plasma and due to its intrinsic fluorescence, that can be reduced by interaction of drugs, allowing the evaluation of binding affinity to plasmatic proteins by the ILs-APIs (Active Pharmaceutical Ingredients).

Simultaneously, the partition of the three IIs-APIs was analyzed between the aqueous and lipid phases, formed by micelles of hexadecylphosphocholine, that were used due to their structural similarity to the lipids present in biological membranes. Through this assay the partition coefficient (Kp) was calculated by derivative spectrophotometry in the ultraviolet-visible region.

The HSA binding affinity results revealed that choline naproxenate establishes a stronger binding with HSA in comparison with the reference drug, naproxen. In the Kp determination assays an increasing of the partition of choline ibuprofenate was observed in relation to ibuprofen, suggesting an improvement in the ability to pass through biological membranes.

**Keywords:** *pharmaceutical ionic liquids; dissociation constant; partition coefficient; spectroscopic methodologies.*

## RESUMEN

Los líquidos iónicos (LIs) han demostrado un gran potencial en varias áreas a nivel de laboratorio o industrial. Dichos compuestos se definen generalmente como sales orgánicas que consisten en un catión orgánico y un anión orgánico o inorgánico con puntos de fusión por debajo de los 100 °C.

En este trabajo la interacción de los líquidos iónicos que contienen cationes basados en la colina y los aniones ibuprofenato, naproxenato y cetoprofenato, con albúmina sérica humana (ASH) se estudia por espectrofluorimetría. La ASH fue seleccionada como la proteína más abundante en el plasma, la cual exhibe una fluorescencia intrínseca que puede ser reducida por la interacción con los fármacos, lo que permite la evaluación de la afinidad de unión a las proteínas plasmáticas por LIs-APIs (del inglés Active Pharmaceutical Ingredients). Al mismo tiempo se analizó la partición de las API de tres LIs entre la fase acuosa y lipídica, formada por micelas de hexadecilfosfocolina, que han sido seleccionadas ya que exhiben una similitud estructural con los lípidos presentes en las membranas biológicas. Este ensayo permitió el cálculo de la derivada del coeficiente de partición (Kp) por espectrofotometría ultravioleta-visible.

Estos resultados preliminares obtenidos mediante el estudio de la interacción de los LIs-APIs con HSA muestran que naproxenato colina establece una fuerte conexión al HSA en comparación con el naproxeno. A su vez, los valores Kp muestran un aumento en relación con la partición de ibuprofenato colina en relación con el ibuprofeno, lo que sugiere una mejora en la capacidad de atravesar las membranas biológicas.

**Palabras clave:** *líquidos iónicos farmacéuticos; constante de disociación; coeficiente de partición; metodologías espectroscópicas.*

\* Aluna da Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda

\*\* Unidade de Investigação para o Desenvolvimento do Interior (UDI) e Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico da Guarda

\*\*\* LAQV, REQUIMTE, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Submitted: 21st November 2015

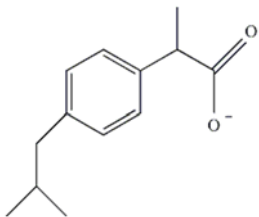
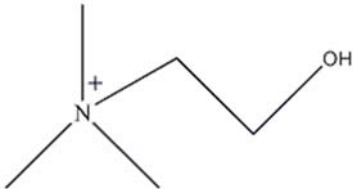
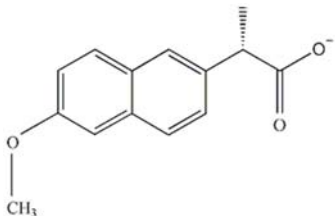
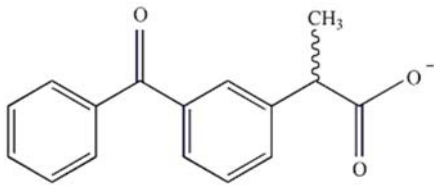
Accepted: 13th July 2016

## INTRODUÇÃO

A indústria farmacêutica está a atravessar uma fase de enormes desafios sendo cada vez mais difícil obter novos compostos químicos. De facto, apenas 10% dos fármacos que são avaliados em ensaios clínicos chegam ao mercado, o que se deve principalmente a problemas de solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade [1,2].

A maioria das indústrias farmacêuticas está dependente de fármacos na forma de sais, cristais e estruturas sólidas, principalmente por razões de pureza, fabrico e também facilidade de manuseamento. No entanto, continuam a existir problemas associados com a forma farmacêutica de muitos fármacos no estado sólido, nomeadamente problemas relacionados com a formação de polimorfismos, baixa solubilidade, baixa biodisponibilidade e cristalização espontânea de formas amorfas, assim procuram-se alternativas que assegurem o transporte através das membranas e a eficiência dos fármacos com os menores efeitos secundários possíveis [3,4]. Neste contexto, diversos autores têm estudado uma nova geração de líquidos iónicos (LIs), baseados em princípios ativos farmacêuticos (LIs-APIs, do inglês *active pharmaceutical ingredients*) [5-7]. A pesquisa nesta área foca-se principalmente na síntese de novos compostos por associação de diferentes iões ativos (aniões e catiões) [5,8,9]. Os LIs são sais orgânicos constituídos por um catião orgânico e um anião orgânico ou inorgânico, com pontos de fusão inferiores a 100°C. Por norma estes compostos são sólidos à temperatura ambiente, mas podem também apresentar-se no estado líquido [6]. Com base nas suas propriedades e respetivas aplicações, os LIs podem ser agrupados em três gerações distintas [7]. A primeira geração inclui LIs com propriedades físicas peculiares, tais como baixa pressão de vapor e elevada estabilidade térmica, que permitiram a sua utilização como alternativa aos solventes orgânicos voláteis. Os LIs de segunda geração resultam da adaptação de propriedades físicas e químicas, sendo proposto o seu emprego como materiais funcionais, nomeadamente como materiais energéticos, lubrificantes e quelantes. Por último, a terceira e mais recente geração compreende LIs-APIs que apresentam atividade biológica [5,6].

Neste contexto, realizaram-se ensaios *in vitro* com o objetivo de estudar a afinidade de ligação às proteínas plasmáticas e a lipofilia de três novos LIs-APIs com o objetivo de prever a sua biodisponibilidade e capacidade de interagir com as membranas biológicas e consequentemente a sua eficácia. Os LI-APIs selecionados são constituídos por um anião com atividade anti-inflamatória (ibuprofenato, naproxenato e cetoprofenato) em associação com o catião colina (figura 1).

LIS-APIS	ANIÃO	CATIÃO
IBUPROFENATO DE COLINA		
NAPROXENATO DE COLINA		
CETOPROFENATO DE COLINA		

*Figura 1 – Fórmulas de estrutura química dos aniões e do catião dos Lis-APIs em estudo.*

No campo do estudo da afinidade de ligação às proteínas plasmáticas, a albumina do soro humano (ASH) é a proteína mais abundante no plasma humano e, certamente, a mais importante no transporte de compostos endógenos e exógenos, sendo desta forma considerada como um modelo para o estudo da interação *in vitro* dos fármacos com esta [10]. A ASH apresenta fluorescência intrínseca que é conferida maioritariamente pelo resíduo de triptofano e que pode ser reduzida por interação com ligandos. Assim, a espectrofluorimetria torna-se uma ferramenta importante para a implementação deste tipo de estudo. No presente trabalho, os estudos de afinidade de ligação às proteínas plasmáticas basearam-se na inibição da fluorescência intrínseca da ASH, através da determinação da constante de dissociação ( $K_d$ ) [11].

Relativamente à avaliação da lipofilia de novos fármacos, a determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) tem sido tradicionalmente realizada recorrendo ao sistema octanol/água ( $K_o/a$ ), não sendo considerada a natureza iónica dos compostos. Recentemente, vários autores propuseram alternativas para contornar esta situação, tendo surgido os modelos membranares lipídicos [12,13]. Estes são mais adequados para a determinação do  $K_p$ , uma vez que mimetizam o interior hidrofóbico e a superfície polar carregada de fosfolípidos presentes nas biomembranas. Desta forma, para a determinação do  $K_p$  recorreu-se a micelas de hexadecilfosfatidilcolina (HDPC) como modelo de membrana e à espectrofotometria derivativa no ultravioleta-visível (UV-Vis) como técnica de deteção. As micelas de HDPC, para além de serem

fáceis e rápidas de preparar, também possuem elevada estabilidade e minimizam as interferências espectroscópicas de dispersão de luz, sendo uma forma de contornar o uso de solventes orgânicos tóxicos [14,15].

Assim, com este trabalho pretende-se determinar a  $K_d$  e o  $K_p$  destes LIs-APIs, comparando os dados com os anti-inflamatórios de referência, reunindo informações que suportem a aplicação futura dos LIs-APIs na indústria farmacêutica.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **REAGENTES E SOLUÇÕES**

Na preparação de todas as soluções aquosas foi utilizada água ultrapura com uma condutividade específica inferior a  $0,1 \mu\text{Scm}^{-1}$ , obtida a partir de água de consumo por passagem em resinas de troca iônica, incorporadas num aparelho específico de desionização (Milli-Q®, modelo RG). Os reagentes usados possuíam qualidade analítica apropriada.

A ASH (fração V), o sal sódico do ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N-etanosulfônico (Hepes), e os fármacos anti-inflamatórios não esteróides, ibuprofeno sódico, naproxeno sódico e cetoprofeno foram adquiridos à Sigma Aldrich, Co. e usados sem purificação adicional. O lípido HDPC foi adquirido à Cayman Chemicals e armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ .

A solução tampão fosfato era constituída por cloreto de sódio (140 mM), hidrogenofosfato de sódio (Sigma Aldrich, Co, 7,5 mM) e dihidrogenofosfato de potássio (1,5 mM) e o seu pH ajustado a 7,4 unidades.

A solução tampão Hepes foi constituída por 0,01 M Hepes e 0,1 M NaCl, com pH ajustado a 7,4 unidades e armazenada no frigorífico a  $4^\circ\text{C}$ . As duas soluções tampão eram armazenadas no frigorífico, permanecendo estáveis durante pelo menos três semanas.

Todas as “soluções-mãe” de ASH foram preparadas em água.

Os LIs-APIs em estudo, ibuprofenato de colina, naproxenato de colina e cetoprofenato de colina foram sintetizados e disponibilizados pelo Instituto de Química de Síntese Aplicada, da Universidade Tecnológica de Viena (Áustria), armazenados à temperatura ambiente, ao abrigo da luz e em ambiente anidro.

As soluções concentradas de fármacos e LIs-APIs utilizadas no ensaio de desativação da fluorescência (tabela 1) foram preparadas em solução tampão fosfato, tendo a dissolução sido auxiliada, quando necessário, por meio da utilização de um banho de ultrassons Seleta Ultrasons® durante um curto período de tempo.

LI-API /FÁRMACO	[LI-API/FÁRMACO] ( $\mu\text{M}$ )	[SOLUÇÃO-MÃE ASH] ( $\mu\text{M}$ )	[ASH] FINAL ( $\mu\text{M}$ )
IBUPROFENATO DE COLINA E IBUPROFENO	2,5; 10; 250; 500; 750; 1000	0,48; 6; 30; 60	0,16; 2; 10; 20
NAPROXENATO DE COLINA E NAPROXENO	300	30	10
CETOPROFENATO DE COLINA E CETOPROFENO	100	6	2

Tabela 1 – Concentrações utilizadas para o estudo do K<sub>d</sub> dos Lis-APIs/fármacos.

As “soluções-mãe” de ibuprofeno sódico e ibuprofenato de colina (5000  $\mu\text{M}$ ), naproxeno sódico e naproxenato de colina (800  $\mu\text{M}$ ), cetoprofeno e cetoprofenato de colina (250  $\mu\text{M}$ ) utilizadas nos ensaios de determinação de K<sub>p</sub> foram preparadas em tampão Hepes.

Na determinação do K<sub>p</sub> utilizaram-se as soluções de HDPC 600  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  em tampão Hepes, sendo a última obtida por diluição da “solução-mãe”.

## INSTRUMENTAÇÃO

As medições da intensidade de fluorescência foram efetuadas num espectralfluorímetro Perkin Elmer® LS 50B, ligado a um dispositivo de controlo da temperatura por circulação de água termostatzada, o que permitiu a realização dos ensaios à temperatura de  $37,0 \pm 0,1$  °C. Todas as determinações foram efetuadas em células de quartzo com 1cm de percurso ótico. A intensidade de fluorescência era adquirida nas condições abaixo apresentadas (tabela 2).

LI-API/FÁRMACO	$\lambda_{\text{EX}}$	$\lambda_{\text{EM}}$	$SLIT_{\text{EX}}^{(A)}$	$SLIT_{\text{EM}}^{(A)}$
IBUPROFENATO DE COLINA E IBUPROFENO	280 NM	340; 350 NM	5; 15	5; 15
NAPROXENATO DE COLINA E NAPROXENO	295 NM	320 NM	5	5
CETOPROFENATO DE COLINA E CETOPROFENO	280 NM	330 NM	5	5

Tabela 2 – Condições otimizadas para a leitura pontual da fluorescência.

largura de fenda

Todas as leituras de absorvância no UV-Vis relativas às determinações de K<sub>p</sub> foram efetuadas num leitor de microplacas da BioTek®, modelo Synergy HT, no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 500 nm. Para a implementação do ensaio foram utilizadas microplacas de 96 poços adquiridas da BD Falcon.

## MÉTODOS

### **Determinação da constante de dissociação ( $k_d$ )**

Os ensaios de desativação da fluorescência foram realizados por adição de 500  $\mu\text{L}$  de solução de ASH de concentração fixa a diferentes volumes de “solução-mãe” de fármaco/LI-API de modo a obter soluções com concentração crescente dos mesmos. O tampão fosfato ajustado a pH 7,4 foi usado para perfazer um volume final de 1500  $\mu\text{L}$ . As soluções de referência foram preparadas de igual forma, mas sem a adição do fármaco. Posteriormente, as amostras e soluções de referência foram incubadas a 37,0 °C, durante aproximadamente 10 minutos. Por último, efetuou-se a leitura da intensidade de fluorescência com os  $\lambda_{\text{ex}}$  e  $\lambda_{\text{em}}$  ajustados para cada fármaco/ LI-API (tabela 2).

As amostras de cetoprofenato de colina e cetoprofeno tinham uma concentração que variava entre 0 e 40  $\mu\text{M}$  e o naproxenato de colina e naproxeno sódico entre 0 e 190  $\mu\text{M}$ . Quanto às amostras de ibuprofenato de colina e ibuprofeno foram testadas várias concentrações compreendidas entre 1  $\mu\text{M}$  e 190  $\mu\text{M}$ .

Os valores de intensidade de fluorescência foram corrigidos devido à contribuição de alguns fatores para a dispersão da luz, pela subtração das absorvâncias (no mesmo  $\lambda$ ) obtidas a partir da análise da respetiva amostra no espectrofotômetro. Contudo, estas contribuições foram sempre desprezáveis, com valores abaixo de 0,5%.

### **Determinação do coeficiente de partição ( $k_p$ )**

O estudo da partição dos fármacos/LI-APIs entre a fase aquosa e lipídica foi realizado por espectrofotometria derivativa no UV-Vis através de um ensaio realizado numa microplaca de 96 poços à qual eram adicionados fármaco/LI-API, tampão Hepes e HDPC, de acordo com a tabela 3. Relativamente às soluções de referência, estas eram preparadas de igual forma, mas na ausência de fármaco/LI-API, este foi substituído por tampão Hepes.

Os espectros de absorção das amostras e referências foram medidos à temperatura de 37,0  $\pm$  0,1 °C entre 200 e 500 nm, em intervalos de 2 nm, num leitor de microplacas como referido anteriormente.

Poço	Volume de fármaco/LI-API (μL) <sup>a</sup>	Volume de tampão Hepes (μL)	Volume de HDPC (μL)	[HDPC] (μM) <sup>b</sup>
D	50	250	-	0,0
S1	50	235	15 <sup>c</sup>	7,5
S2	50	230	20 <sup>c</sup>	10
S3	50	210	40 <sup>c</sup>	20
S4	50	190	60 <sup>c</sup>	30
S5	50	170	80 <sup>c</sup>	40
S6	50	150	100 <sup>c</sup>	50
S7	50	100	150 <sup>c</sup>	75
S8	50	70	180 <sup>c</sup>	90
S9	50	200	50 <sup>d</sup>	100
S10	50	175	75 <sup>d</sup>	150
S11	50	150	100 <sup>d</sup>	200

Tabela 3 – condições do ensaio de determinação do  $K_D$ .

(adaptado de [15])

(a) as referências foram preparadas adicionando 50 μl de tampão hepes em vez de fármaco/li-api. (b) concentração de hdpc no poço da microplaca. (c) a concentração da suspensão de hdpc é 100 μm. (d) a concentração da suspensão de hdpc é 600μm.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### CONSTANTE DE DISSOCIAÇÃO ( $K_D$ ) FÁRMACO/LI-API-ASH

O estudo da interação do fármaco/LI-API selecionado com a ASH, através da determinação experimental do  $K_D$ , possibilita recolher informações que podem ser úteis na previsão e compreensão dos processos de distribuição e bioacumulação no organismo. Para tal, recorreu-se à espectrofotometria no UV-Vis que permitiu a leitura da absorvância e à espectrofluorimetria que permitiu a determinação da intensidade de fluorescência. Após a subtração dos valores de intensidade de fluorescência das referências procedeu-se ao cálculo dos valores de  $K_D$  com e sem depleção do ligando [16].

A depleção de ligando é considerada quando este possui alta afinidade para o recetor, já que neste caso à medida que o ligando estabelece ligação com a proteína, a sua concentração livre diminui.

Os dados da intensidade de fluorescência e absorvância foram inseridos numa folha de cálculo. Posteriormente recorreu-se ao programa Origin 6.1<sup>®</sup> para obter os valores de  $K_D$ .

Os resultados obtidos nos estudos de ligação dos fármacos/LIs-APIs à ASH encontram-se compilados na tabela 4.



LI-API/fármaco <sup>(a)</sup>	K <sub>d</sub> (μM)		ΔG <sub>binding</sub> (Kcalmol <sup>-1</sup> )
	Binding sem depleção do ligando	Binding com depleção do ligando	
Naproxeno sódico	28,98±3,76	22,59±3,60	-6,58
	R <sup>2</sup> =0,9872	R <sup>2</sup> =0,9933	
Cetoprofeno	5,01±0,64	3,84±0,58	-7,68
	R <sup>2</sup> =0,9464	R <sup>2</sup> = 0,9761	
Naproxenato de colina	20,05±2,63	14,71±2,45	-6,85
	R <sup>2</sup> = 0,9935	R <sup>2</sup> = 0,9958	
Cetoprofenato de colina	6,48±0,53	5,11±0,52	-7,50
	R <sup>2</sup> = 0,9760	R <sup>2</sup> = 0,9874	

Tabela 4 - Resultados dos parâmetros calculados a partir do estudo da interação dos Lis-APIs e dos fármacos testados com a ASH, a 37,0 °C.

(a)O número de locais de ligação para todos os casos foi de n=1.

Da análise da tabela 4 verifica-se que os compostos estudados estabelecem uma ligação forte à ASH (K<sub>d</sub> <100 μM), em que, todas as interações ocorrem de forma espontânea (ΔG <0), tal como os estudos de Pinto, P. C. A. G. et al [17] e de Azevedo A. M.O. et al. [18]. De uma forma geral, quando os resultados experimentais foram tratados considerando a depleção do ligando, verificou-se uma ligeira diminuição dos valores de K<sub>d</sub>, o que indica que não afeta significativamente o cálculo dos constantes de ligação.

O naproxenato de colina estabelece uma ligação mais forte com a ASH em comparação com o naproxeno (valor de K<sub>d</sub> inferior). Por sua vez, o cetoprofenato de colina parece afetar negativamente a ligação à ASH quando comparado com o cetoprofeno (valor de K<sub>d</sub> superior). Neste contexto, e atendendo ao facto dos Lis-APIs selecionados apresentarem o mesmo catião (colina), as alterações observadas poderão ser devidas à influência do anião. Foi também reportado num estudo anterior um aumento de K<sub>d</sub> quando usados líquidos iónicos, apesar de o fármaco nimesulide ainda se ter ligado à ASH mediante fortes interações e de forma espontânea [18].

Assim, no caso do naproxeno, a sua utilização na forma de líquido iónico melhora a sua capacidade de penetração das membranas biológicas, enquanto que no caso do cetoprofeno não se traduz num aumento dessa capacidade, porém não altera de forma substancialmente negativa essa capacidade.

Relativamente ao ibuprofeno e ibuprofenato de colina não foi possível a determinação do K<sub>d</sub> por esta metodologia espectroscópica. Apesar de terem sido testadas várias combinações de concentrações para este fármaco/LI-API e para a ASH, bem como se ter testado uma maior largura de fenda, não se conseguiram obter diferenças significativas nos valores de intensidade de fluorescência entre os diferentes padrões testados (Tabelas 1 e 2).

A título de exemplo são apresentados nas figuras de 1 a 4 os gráficos do ajuste da desativação da fluorescência intrínseca (*Quenching* – redução da fluorescência intrínseca) da ASH, expressa em % de redução da intensidade de fluorescência (IF), para concentrações crescentes dos fármacos/Lis-APIs em estudo.

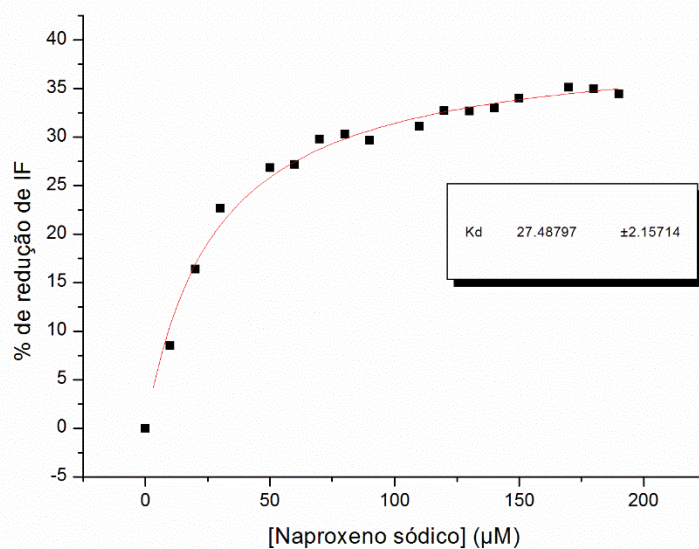


Figura 1: Representação gráfica do ajuste da desativação da fluorescência da ASH por concentrações crescentes de naproxeno sódico, segundo o modelo de Langmuir.

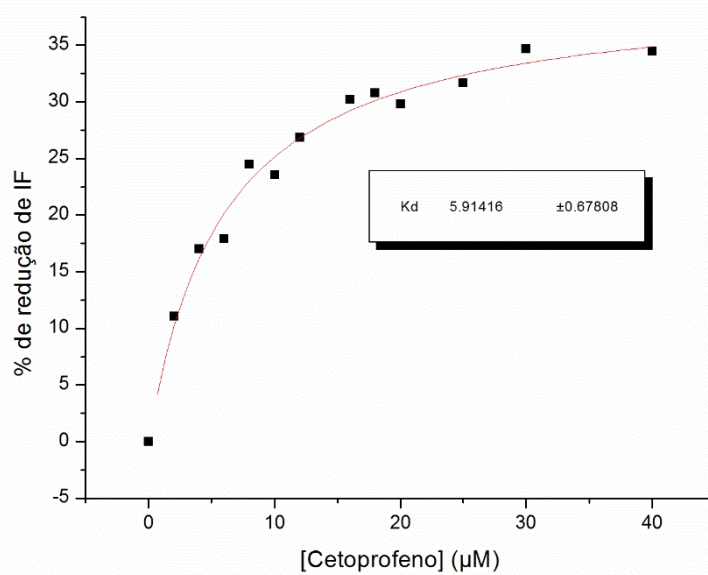


Figura 2: Representação gráfica do ajuste da desativação da fluorescência da ASH por concentrações crescentes de cetoprofeno, segundo o modelo de Langmuir com o cálculo do número de locais de ligação.

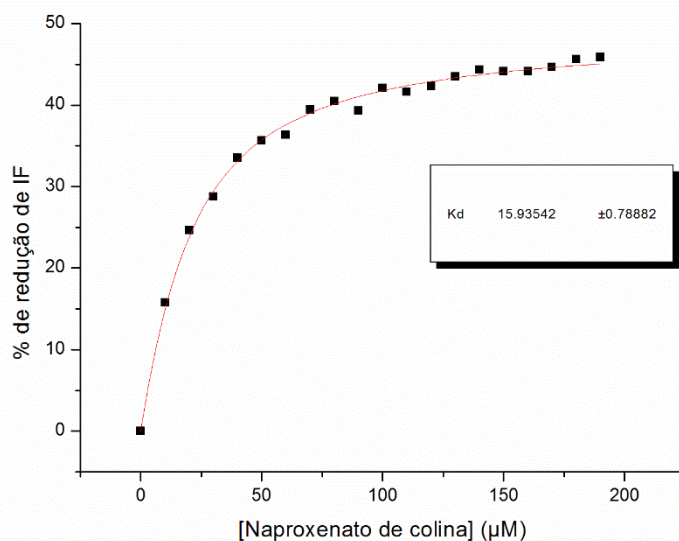


Figura 3: Representação gráfica do ajuste da desativação da fluorescência da ASH por concentrações crescentes de naproxenato de colina, segundo o modelo de *binding* com depleção do ligando.

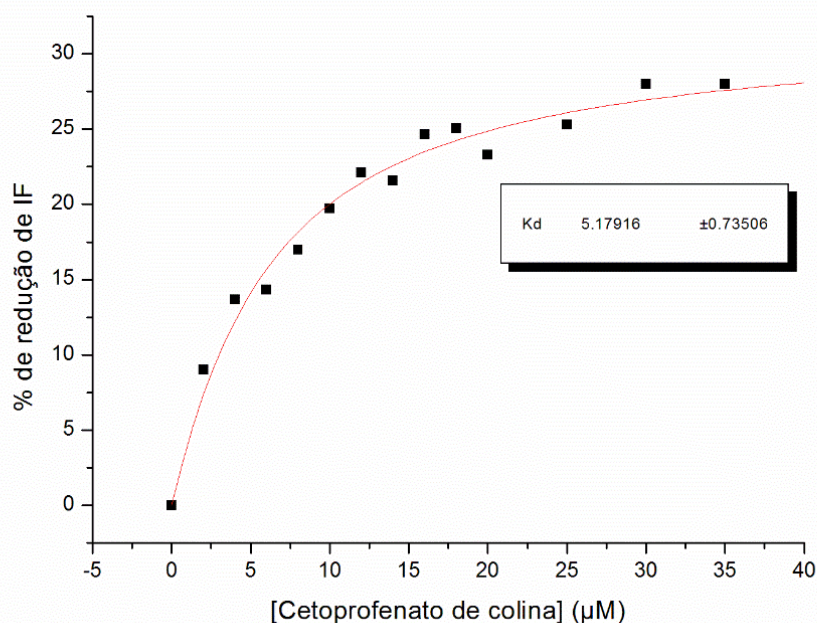


Figura 4: Representação gráfica do ajuste da desativação da fluorescência da ASH por concentrações crescentes de cetoprofenato de colina, segundo o modelo de *binding* com depleção do ligando.

Com o aumento da concentração de fármaco/LI-API, há um aumento da porcentagem de desativação da fluorescência, indicando um aumento da fração de fármaco/LI-API ligada à ASH. Para além disso, verifica-se a estabilização da porcentagem de desativação da fluorescência que sugere uma saturação dos locais de ligação.

Genericamente, e de acordo com os resultados obtidos, pode-se antever que o naproxenato de colina e o cetoprofenato de colina apresentam um perfil de distribuição adequado, o que poderá favorecer a sua ação no organismo.

### COEFICIENTE DE PARTIÇÃO ( $K_p$ ) FÁRMACO/LI-API-HDPC

Os valores de  $K_p$  foram calculados num sistema de micela que permitiram avaliar a lipofilia dos fármacos/LIs-APIs em estudo. Através destes ensaios pretendeu-se recolher dados que possam ajudar na previsão dos processos de interação/difusão, através das membranas biológicas.

Em relação ao tratamento dos resultados foi utilizada uma folha de cálculo do Microsoft Excel desenvolvida por Magalhães LM et al. para o cálculo do  $K_p$  (Calculadora do  $K_p$ ) [15]. Este programa permite subtrair cada espectro de referência a partir dos espectros da amostra correspondente e obter espectros de absorção corrigidos. Posteriormente, através da técnica de espectrofotometria derivativa no UV-Vis obtém-se os espectros da primeira, segunda e terceira derivada, visando a eliminação de interferências espectralis resultantes da luz dispersa pelas micelas de HDPC. Depois disto, recorreu-se ao programa Origin 6.1® que é capaz de calcular os valores de  $K_p$  dos compostos em  $M^{-1}$ , através de um método de ajuste não linear.

$$D = Da + \frac{(Dm - Da)Kp [L]}{1 + Kp [L]} \quad (1)$$

A título de exemplo são apresentados, nas figuras 5-7, os gráficos de ajuste dos dados experimentais relativos à primeira, segunda e terceira derivadas do cetoprofenato de colina, ibuprofenato de colina e naproxenato de colina, respetivamente.

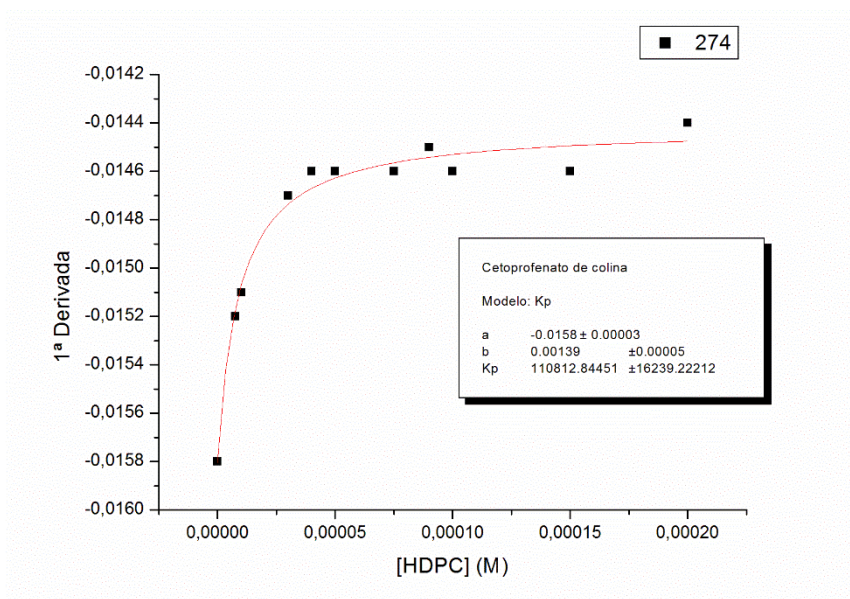


Figura 5: Representação gráfica do ajuste, pelo método de regressão não linear, dos dados experimentais relativos à primeira derivada do espectro de absorvância do cetoprofenato de colina em micelas de HDPC ao  $\lambda$  de 274 nm.



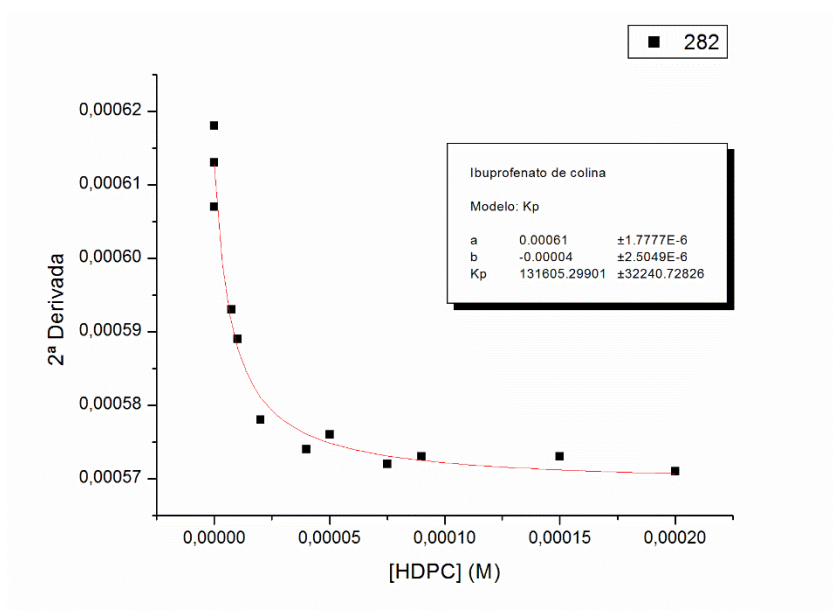


Figura 6: Representação gráfica do ajuste, pelo método de regressão não linear, dos dados experimentais relativos à segunda derivada do espectro de absorvância do ibuprofenato de colina em micelas de HDPC ao  $\lambda$  de 282 nm.

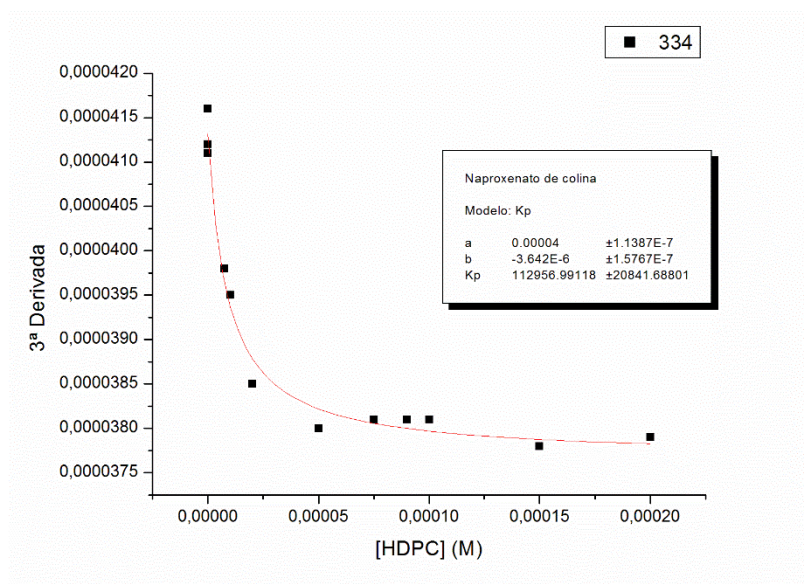


Figura 7: Representação gráfica do ajuste, pelo método de regressão não linear, dos dados experimentais relativos à terceira derivada do espectro de absorvância do naproxenato de colina em micelas de HDPC ao  $\lambda$  de 334 nm.

Seguidamente são também apresentados na tabela 5 os dados compilados dos valores de  $K_p$  obtidos para todos os compostos em estudo.

Composto	$K_p$ ( $M^{-1}$ )
Cetoprofeno	$111332 \pm 9981$
Naproxeno sódico	$115562 \pm 8295$
Ibuprofeno sódico	$118444 \pm 9516$
Cetoprofenato de colina	$113989 \pm 9407$
Naproxenato de colina	$113988 \pm 8080$
Ibuprofenato de colina	$130660 \pm 6220$

Tabela 5 – Coeficiente de partição ( $K_p$ ) dos compostos estudados (o valor corresponde à média e respetivo desvio padrão de pelo menos dois ensaios independentes).

Os resultados obtidos evidenciam que o ibuprofeno sódico, dos três fármacos estudados, é aquele que apresenta valores de  $K_p$  ligeiramente superiores, seguido do naproxeno sódico e do cetoprofeno, como se pode constatar na tabela 5.

Relativamente aos LI-APIs os valores de  $K_p$  do cetoprofenato de colina e do naproxenato de colina aproximam-se dos valores dos fármacos de referência, enquanto o ibuprofenato de colina é o LI-API com maior valor de  $K_p$  ( $130660 \pm 6220$ ) sendo 1,1 vezes superior ao fármaco de referência (ibuprofeno sódico). De facto, aplicando o teste não paramétrico de Wilcoxon, verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre o par ibuprofenato de colina/ibuprofeno sódico, para um nível de significância de 5% ( $p=0,046 < 0,05$ ). O cetoprofenato de colina e o naproxenato de colina, apresentam valores de  $K_p$  muito parecidos com os fármacos de referência e como tal, não se diferenciam na partição em micelas de HDPC. Nestes dois pares, não existem diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,477$  e  $p=0,820$ , respetivamente).

Como pode ser observado, o ibuprofenato de colina é o composto que apresenta maior separação entre a fase aquosa e lipídica pelo facto de apresentar um valor de  $K_p$  superior ao do ibuprofeno sódico. De facto, outros autores verificaram que os valores de  $K_p$  para o nimesulide na presença de líquidos iónicos eram superiores entre 2,5 a 3 vezes quando comparado com o nimesulide dissolvido em água [18]. Por outro lado, foi demonstrado que APIs baseados no anião salicilato possuíam valores de  $K_p$  superiores até 6 vezes quando comparado com o seu sal inorgânico [17]. O mesmo foi verificado para o docusato de tetraciclina, cujos coeficientes de partição octanol/água foram até cerca de 3 vezes superiores aos determinados para o cloridrato de tetraciclina [19]. Num outro estudo [20], os APIs baseados no anião salicilato e ibuprofenato demonstraram maior capacidade de permeação e atravessando a membrana com maior rapidez (através da determinação dos coeficientes de difusão e dos tempos para obtenção de uma saturação igual a 50 %)

Dado isto e em face dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se prever que este é o LI-API com melhor capacidade de atravessar as membranas biológicas, apresentando vantagens relativamente ao processo de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação (ADME).

## CONCLUSÃO

Neste trabalho estudou-se a afinidade de ligação à ASH e a lipofilia de três LIs-APIs, com o objetivo de fornecer informações sobre o seu perfil farmacocinético.

No que diz respeito ao estudo de afinidade de ligação à ASH verificou-se que todos os compostos se ligam fortemente à ASH ( $K_d$  até 30  $\mu M$ ), e por meio de interações espontâneas, evidenciado pelos valores negativos de  $\Delta G$ . O naproxenato de colina parece estabelecer uma ligação mais forte com a ASH em comparação com o naproxeno, enquanto com o cetoprofenato de colina a ligação à ASH parece ser afetada negativamente quando comparado com o cetoprofeno.

Em relação aos ensaios de  $K_p$  pode-se concluir que o composto que apresenta uma maior lipofilia, e portanto se parece encontrar mais apto para penetrar nas membranas biológicas, é o ibuprofenato de colina, uma vez que foi o composto que apresentou valores de  $K_p$  superiores, quer em relação ao ibuprofeno sódico quer em relação aos outros fármacos/LIs-APIs. Como tal, e apesar de esse aumento ser pouco expressivo (embora estatisticamente significativo), o ibuprofenato de colina poderá ser considerado uma alternativa ao sal sódico relativamente ao processo ADME. Por outro lado, pode-se concluir que o naproxenato de colina e o cetoprofenato de colina quando comparados com os fármacos de referência correspondentes apresentam valores de  $K_p$  muito próximos (no caso do naproxenato de colina o valor de  $K_p$  é mesmo inferior), não apresentando qualquer vantagem relativamente à lipofilia. Por outro lado, a maior solubilidade dos LIs-APIs relativamente aos fármacos de referência deve ser tida em conta, o que pode melhorar o processo de absorção.

Em conclusão, o trabalho desenvolvido abre perspetivas interessantes sobre a possibilidade de utilizar estes LIs-APIs. Todavia, seria importante a realização de estudos adicionais de forma a se obter uma maior consistência dos resultados, bem como estudos de toxicidade e estabilidade, por forma a proceder a uma caracterização e avaliação mais completa destes LIs-APIs, para constituírem uma alternativa válida em relação aos fármacos de referência.

## REFERÊNCIAS

- [1] DI, L.; KERNS, E. H.; (2003), PROFILING DRUG-LIKE PROPERTIES IN DISCOVERY RESEARCH CURR OPIN CHEM BIOL, 7, 402-408.
- [2] GORDIAN, M.; SINGH, N.; ZEMMEL, R.; ELIAS, T.; (2006), WHY PRODUCTS FAIL IN PHASE III IN VIVO APRIL, 1-8.
- [3] CAINS, P. W. (2007) SOLID-STATE CHEMISTRY IN DRUG DEVELOPMENT, CHEM TODAY, 25, 10-12.
- [4] VARIANKAVAL, N.; COTE, A. S.; DOHERTY, M. F. (2008), FROM FORM TO FUNCTION: CRYSTALLIZATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS, AIChE JOURNAL, 54, 1682-1688.
- [5] FERRAZ, R., BRANCO, L., PRUDÊNCIO, C., PETROVSKI, Z. (2011), IONIC LIQUIDS AS ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS, CHEM MED CHEM, 6, 975-985.
- [6] HOUGH, W. L., ROGERS, R. D. (2007), IONIC LIQUIDS THEN AND NOW: FROM SOLVENTS TO MATERIALS TO ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS, B CHEM SOC JPN, 80 (12), 2262-2269.
- [7] HOUGH, W. L.; SMIGLAK, M.; RODRIGUEZ, H.; SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; DALY, D. T.; PERNAK, J.; GRISEL, J. E.; CARLISS, R. D.; SOUTULLO, M. D.; DAMS, J. H.; ROGERS, R. D. (2007), THE THIRD EVOLUTION OF IONIC LIQUIDS: ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS, NEW J CHEM, 31, 1429-1436.

- [8] BICA, K.; RIJXSEN, C.; NIEUWENHUYZEN, M.; ROGERS, R. D. (2010), IN SEARCH OF PURE LIQUID SALT FORMS OF ASPIRIN: IONIC LIQUID APPROACHES WITH ACETYLSALICYLIC ACID AND SALICYLIC ACID, *CHEM PHYS*, 12, 2011-2017.
- [9] FERRAZ, R.; BRANCO, L. C.; MARRUCHO, I. M.; ARAUJO, J. M. M.; REBELO, L. P. N.; DA PONTE, M. N.; PRUDENCIO, C.; NORONHA, J. P.; PETROVSKI, Z.(2012), DEVELOPMENT OF NOVEL IONIC LIQUIDS BASED ON AMPICILLIN, *MED CHEM COMM*, 3, 494-497.
- [10] KRAGH-HANSEN, U., CHUANG, V., OTAGIRI, M. (2002), PRACTICAL ASPECTS OF THE LIGAND-BINDING AND ENZYMATIC PROPERTIES OF HUMAN SERUM ALBUMIN, *BIOL PHARM BULL*, 25 (6), 695-704.
- [11] DI MASI, A.; GULLOTTA, F.; BOLLI, A.; FANALI, G.; FASANO, M.; ASCENZI, P. (2011), IBUPROFEN BINDING TO SECONDARY SITES ALLOSTERICALLY MODULATES THE SPECTROSCOPIC AND CATALYTIC PROPERTIES OF HUMAN SERUM HEME-ALBUMIN, *FEBS J*, 278, 654-662.
- [12] CARNEIRO, C. (2001), O PAPEL DAS INTERAÇÕES FÁRMACO-MEMBRANA NOS FEITOS CARDIOVASCULARES DE **B**-BLOQUEADORES, DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE CONTROLO DE QUALIDADE, PORTO.
- [13] FERREIRA, H., LÚCIO, M., MARLENE, S. REIS S. (2005), UTILIZAÇÃO DE MODELOS MEMBRANARES NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE FÁRMACOS, *QUÍMICA*, 99, 39-51.
- [14] CASTRO, B., GAMEIRO, P., GUIMARÃES, C., LIMA, J., REIS, S. (2001), A FAST AND RELIABLE SPECTROSCOPIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF MEMBRANE-WATER PARTITION COEFFICIENTS OF ORGANIC COMPOUNDS, *LIPIDS*, 36, 89-96.
- [15] MAGALHAES, L.M.; NUNES, C.; LÚCIO, M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C. (2010), HIGHTHROUGHPUT MICROPLATE ASSAY FOR THE DETERMINATION OF DRUG PARTITION COEFFICIENTS, *NAT PROTOC*, 5, 1823-1830.
- [16] COPELAND, R.A., 2000, *ENZYMES*. WILEY-VCH, NEW YORK.
- [17] PINTO, C. A. G.; RIBEIRO, D. M. G. P., AZEVEDO, A. M. O.; DELA JUSTINA, V.; CUNHA, E.; BICA, K., VASILOIU, M., REIS, S.; SARAIVA, M. L.M. F. S. SARAIVA (2013), ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS BASED ON SALICYLATE IONIC LIQUIDS: INSIGHTS INTO THE EVALUATION OF PHARMACEUTICAL PROFILES, *NEW J CHEM*, 37, 4095-4102.
- [18] AZEVEDO, A.M.O.; RIBEIRO, D. M. G. P., PINTO, C. A. G.; LÚCIO, M.; REIS, S., SARAIVA, M.L. M.F.S. IMIDAZOLIUM IONIC LIQUIDS AS SOLVENTS OF PHARMACEUTICALS: INFLUENCE ON HSA BINDING AND PARTITION COEFFICIENT OF NIMESULIDE, *INT J PHARM* 443 (2013) 273– 278.
- [19] ALVES, F.; OLIVEIRA, F. S.; SCHRÖDER, B.; MATOS, C.; MARRUCHO, I. M.. SYNTHESIS, CHARACTERIZATION, AND LIPOSOME PARTITION OF A NOVEL TETRACYCLINE DERIVATIVE USING THE IONIC LIQUIDS FRAMEWORK, *J PHARM SCI* 102 (2013) 1504–1512.
- [20] JELENA STOIMENOVSKI, J.; MACFARLANE D. R.. ENHANCED MEMBRANE TRANSPORT OF PHARMACEUTICALLY ACTIVE PROTIC IONIC LIQUIDS, *CHEM COMMUN* 47 (2011) 11429–11431.